

**Immunológia gyakorlati alkalmazásai:
immunizálás,
immunhisztokémia**

Passzív immunizálás:

A kórokozóra specifikus ellenanyagok (főleg IgG osztályú antitestek) beadása.

Ellenanyagokkal rendelkező személyek vérsavójából állítják elő (állati savókat ma már igen ritkán használnak)

Jellemzői:

azonnali védelem

átmeneti hatás

az antitestek lebomlanak, kiürülnek: az IgG felezési ideje 21 nap

Antitestek hatásai:

Hozzákötődnek a kórokozó meghatározott antigénjéhez:

- . vírusokat közömbösítik (neutralizálják)
- . baktériumok szaporodását gátolják
- . elősegítik a fagocitózist
- . aktiválják a komplement rendszert

Megkötik (semlegesítik) a toxinokat

Passzív védőoltás hatása függ:

Időzítéstől:

Kevéssel a fertőzés előtt adott oltás a leghatékonyabb

Antitest koncentrációtól:

Hiperimmun savóktól és gammaglobulinoktól várható a legjobb hatás

A passzívan bevitt ellenanyagok neutralizálhatják az élő oltóvírust

Mennyiségtől függően 3 - 12 hónap várakozás is szükséges (újraoltás, ellenanyag vizsgálat)

Aktív immunizáció

Az antigént legyengített vagy veszélytelen formájával antitestek képzésére serkentik

Így nem váltanak ki veszélyes betegséget, de a mikrobákat mint idegen betolakodókat azonosítja a szervezet, és azok immunreakciót váltanak ki.

Ezután az igazi kórokozót már hatékonyabban tudja ártalmatlanítani. Memóriasejtek is kialakulnak, így a védőoltás több évig, akár egész életen át biztosítja a védelmet.

Aktív immunizáció jellemzői:

A létrehozott védettség nem kórokozó specifikus, hanem antigén specifikus.

A vakcináció akkor eredményes, ha a kórokozó patogenitása szempontjából döntő jelentőségű antigénnel (protektív antigén) szemben alakul ki védettség.

Kialakítása:

Elölt kórokozóval (teljes sejt vakcinák ill. előlt vírus vakcinák), vagy a tisztított protektív antigén beadásával (pl. HbsAg, anatoxin). Rövid idejű antitest termelés, ismételt oltások szükségesek.

Patogenitását elvesztett, de antigenitását megtartott élő, attenuált kórokozó bejuttatásával.

Ezek a vírusok a szervezetben szaporodnak, elpusztításukhoz ugyanúgy aktiválódik az immunrendszer, mint a patogén ("vad vírus") leküzdéséhez, ezért a kialakult immunitás sokkal tartósabb

Az antigén inger erősségét és időtartamát meg lehet nyújtani ún. adjuvánsok (pl. aluminium hidroxid) hozzáadásával.

Legújabb törekvések, hogy csupán az antigént kódoló génszakaszt vigyük be a szervezetbe valamilyen "hordozóval". A sejtekbe beépült gén tartósan termeli a protekív antigént.

Az antigén felismerését követően a B és T lymphocyták aktiválódnak, szaporodnak, differenciálódnak (pl. memória sejtekké), és megindul az antitesttermelés. Ez a folyamat hosszabb időt vesz igénybe (átlagosan 1-2 hét), ezért az aktív vakcináció (szemben a passzív immunizáció prompt hatásával) csak lassabban fejti ki védőhatását.

Az aktív védőoltások hatását befolyásoló tényezők:

- . A szervezet immunválasz-készségének aktuális állapota (immunhiányban az oltások hatásossága csökken, élő kórokozót tartalmazó vakcinák veszélyesek).
- . Az oltott életkora.
- . Keringésben jelen lévő antitestek (élő, attenuált vakcinák hatástalanok lehetnek).
- . Az antigén dózisa és hatástartama.
- . A vakcinával bejuttatott antigén antigenitása és a természetes fertőzésben játszott patogenetikai szerepe.
- . A védőoltás alkalmazásának időpontja (a bekövetkező fertőzés előtt vagy után alkalmazzuk).

Immunhisztológia, Immuncitokémia

Módszer előnyei:

specifikus fehérjék előfordulása

specifikus fehérjemolekulák struktúráján belüli helye

specifikus fehérjemolekulák helyének, termelésének megváltozása

kezelés hatására

Kimutatható anyagok:

Szöveti antigének, vagy fél-antigének

Ezek lehetnek fehérjék, glükoproteinek, lipoproteinek

antitesthez fény- vagy elektronmikroszkóppal, illetve esetenként

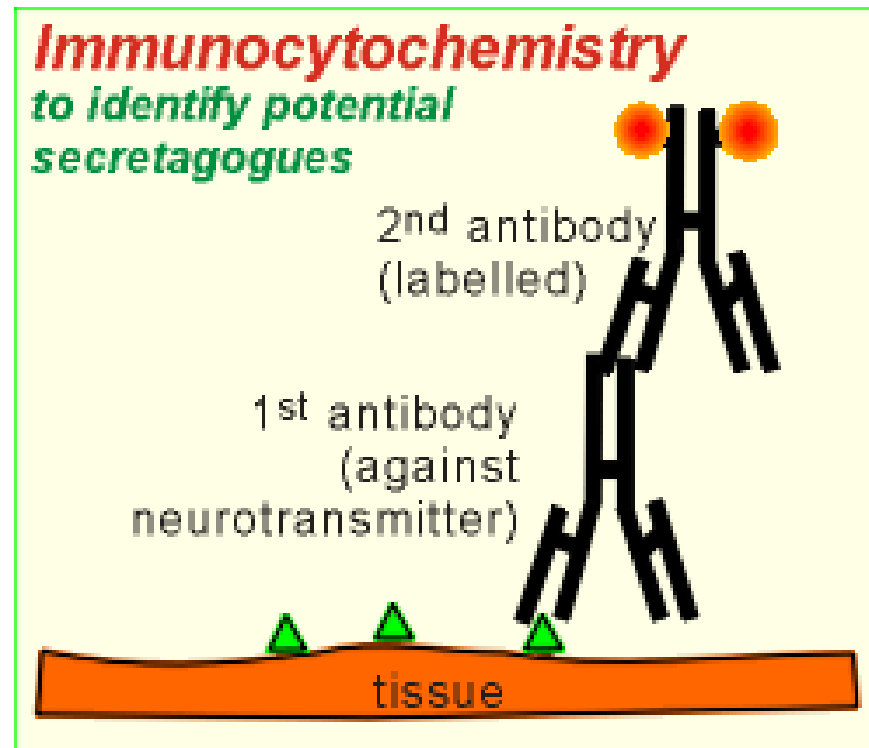
mindkettővel is észlelhető anyag kapcsolható.

Főbb alkalmazási területek

- Sejtcsoportok azonosítása, jellemzése anatómiában
- Gyulladásos infiltrátumok, a vesebetegségek, a degeneratív betegségek jellemzésére
- Fertőző ágensek kimutatása
- Daganatpatológia
 - daganatok differenciációjának megállapítása
 - alcsoportba sorolása
 - nyirokcsomóáttétek azonosítása,
 - prognózis megítélése,
 - terápia alkalmazhatósága
 - terápiás terv kialakítása

Alkalmazás feltétele, hogy a kimutatandó fehérjét tiszta állapotban előállítsuk.

Ezt, mint antigént használjuk fel, specifikus antitestet termeltetünk vele szemben.



Monoklonális antitest:

Egyetlen antigén determináns szekvenciához kötődik.

Antigén-aktivált B-sejtek és myeloma sejtek fúziójából kialakuló monoklonális hibridoma sejtvonalak segítségével termelik.

Legtöbbször egér sejtekből, de lehet patkány, újabban nyúl is.

Előnye: aspecifikus reakciók létrejöttének esélye kicsi, ha megfelelő szekvenciával reagál. Secunder antitestekkel nagy erősítés.

Hátránya: nagyon érzékeny az egyetlen epitop konformációjára (fixáláskor létrejött deformációk az epitopban nagyon leronthatják a jelölődés határfokát). Specifitás ellenőrzésére nagyon oda kell figyelni, esetleges keresztreakcióval eddig számításba nem vett egyéb populáció jelölődhet.

Poliklonális antitestek:

Immunizálás után nyert teljes, vagy tisztított szérumot jelentenek, és legtöbbször több/számos antigén determinánshoz kötődnek ugyanabban az időben.

A poliklonális antitesteket leginkább nyúlban és kecskében termelik, de alkalmazásra kerülhetnek birka, tengeri malac, szamár, ló antiszérumok is.

Előnye: olcsóbb, kevésbé érzékeny a fixálás pontos körülményeire.

Hátránya: nagyobb a háttérfestődés: poliklonális antitest eptopjainak egy része egyéb általunk nem vizsgált fehérjében is előfordulhat.

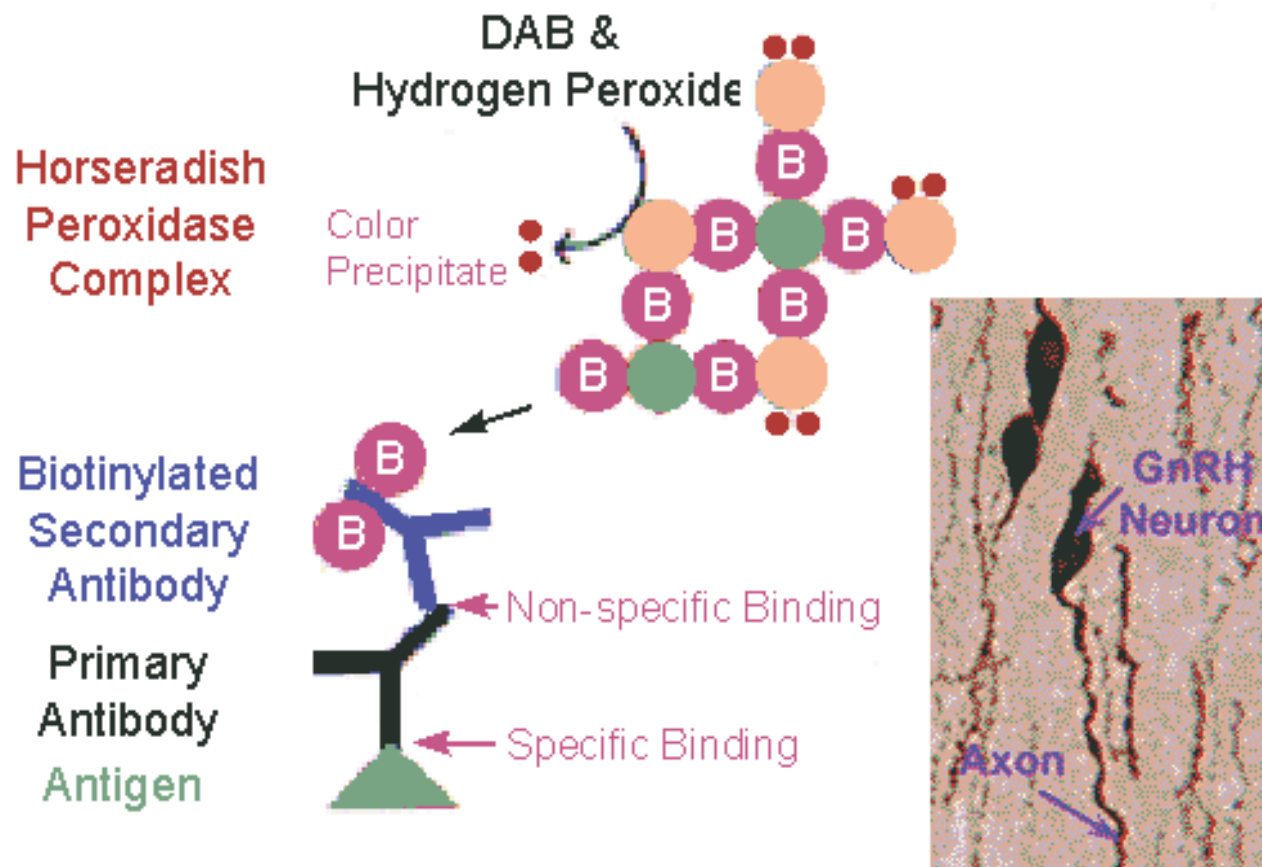
Az antitestekhez, kinyerésük után fény– vagy elektronmikroszkóposan látható anyagokat kapcsolnak kémiai úton. A reakció eredményeképpen a jelzett antitestek specifikus antigénjeikre kötődnek, helyük egyúttal a kérdéses fehérje lokalizációját jelzi.

Fénymikroszkópiában általában fluoreszkáló festékeket (pl. fluorescens izotiocianát–FITC)

Elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz pedig kolloidális aranyszemcséket használnak.

Különböző enzimek ellenanyaghoz kötése (torma–peroxidáz vagy foszfatázok) az antitest kötődése után peroxidáz, savas foszfatáz kimutatást végzünk, ennek reakcióterméke jelzi az antigén helyét.

Immunocytochemistry (ABC protocol)



1. Immunhisztokémiai festés menete

Szövetrögzítés

Célja a szöveti molekulák helyhez kötése, eredeti állapotukhoz közeli megőrzése, az autolitikus folyamatok blokkolása, ill. a szövet megkeményítése a metszhetőség érdekében

Rögzítőszer két csoportja

keresztelő (formaldehid, glutáraldehid)

koagulációs rögzítők (aceton, metanol)

ill. a kettő keverékei

Antigénfeltárás

A formaldehid alapú szöveti rögzítés során a fehérjék természetes konformációját többnyire irreverzibilisen megváltoztató keresztkötések létesülnek, amely révén az antigén determinánsok (epitópok) az antitestek számára hozzáférhetetlenné válhatnak.

Az antigén (epitóp) feltárás célja, hogy az antigén determinánsokat felszabadítsuk, a számunkra fontos epitópokat hozzáférhetővé tegyük úgy, hogy közben a szöveti finomszerkezet nem sérüljön lényegesen.

Antigénfeltáró oldatokban végzett metszetfőzés, mikrosütő, kukta.

Blokkolási lépések

Az antitest molekuláknak a nem a cél antigénhez történő ionos, vagy Fc receptoron keresztüli kötése jelentősen ronthatják a reakciók minőségét, ezért a primer antitesttel végzett inkubálás előtt ezeknek a nem specifikus fehérjekötéseknek a blokkolására van szükség. A nem specifikus kötőhelyek telítésére 10-20%-os non-immun szérumos kezelést alkalmazhatunk.

Nem-specifikus kötőerők nem kívánt határ- illetve háttérfestődést okoznak

Megelőzés:

blokkolás indifferens fehérjével (pl. sovány tejpor)

Inkubálás primer antitesttel:

A primer (fajlagos) antitestek monoklonális („monovalens”), vagy poliklonálisak („polivalens”) lehetnek.

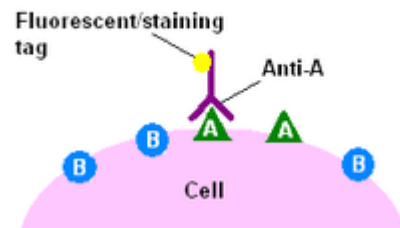
A primer antitestek hígításának a meghatározása a felhasználó laboratóriumok felelőssége. Ha szükséges hígítási kísérlettel kell beállítani az ideális hígítást, mely figyelembe veszi az inkubálási időt, az inkubálási hőmérsékletet és a jelölő rendszer érzékenységét is. Titrálásra lehet szükség minden ismert antitest új csomagjának megnyitása kapcsán is.

Primer antitest kötődés kimutatása:

Az immunhisztokémiai/citokémiai reakció lehet direkt, vagy indirekt.

Direkt reakció:

A vizualizálást elősegítő enzimmal, vagy fluorokrómmal közvetlenül konjugált antitest kerül felhasználásra.



cell: sejt

A: antigén

Anti-A: A antigén ellen termelt antitest

Fluorescent/staining tag: fluorescens/cromofor rész

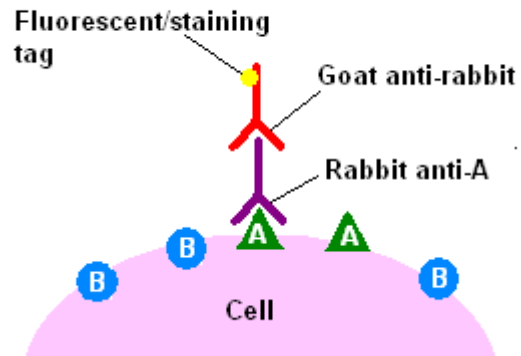
Indirekt reakció:

A jelöletlen primer antitest kötődését a primer antitest elleni második antitesten keresztül mutatják ki.

Második antitestként mindig más állatfajban termelt antitestet használunk mint amiben az primer antitestet termetünk (mivel saját fehérje ellen nem lehet termeltetni antitestet).

Érzékenyebb mint a direkt rakción alapuló módszer, mivel szekunder antitestből egy primer antitesthez több is köthető különböző kötőhelyeken keresztül.

Alkalmazásra kerültek olyan polimer komplexek is, amelyek tartalmazzák a második antitestet és nagyszámú enzimet is.



cell: sejt

A: antigén

Rabbit anti-A: A antigén ellen nyúlban termelt antitest

Goat anti-rabbit: A antigén ellen nyúlban termelt antitest ellen kecskében termelt antitest

Fluorescent/staining tag: fluorescens/cromofor rész

Kontrollok:

Az immunhisztokémiai reakciók végrehajtásának feltétele a megfelelő pozitív és negatív kontroll beiktatása.

Pozitív kontroll:

a specifikus antitestkötődés megtörténtét hivatott bizonyítani.

Pozitív kontrollként a vizsgált metszeten belüli várhatóan pozitív struktúra („belső kontroll”), vagy egy másik, párhuzamosan festett metszetben lévő ismert pozitivitás („külső kontroll”) egyaránt szolgálhat.

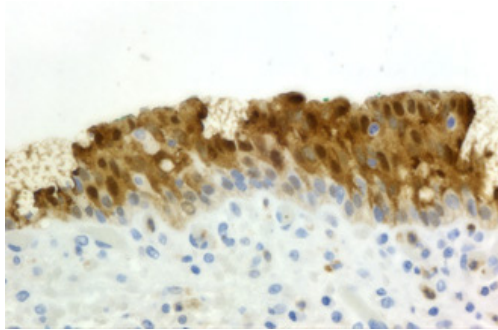
A belső kontroll az ideálisabb.

A külső kontroll esetén hasznos lehet a szöveti multiblokk technika alkalmazása.

Negatív kontroll:

A primer antitest kihagyásával, vagy más immun-, vagy non-immunszérummal történő helyettesítésével végrehajtott reakció beiktatását jelenti, döntően a jelölő rendszer nem specifikus kötődésének a kizárása érdekében.

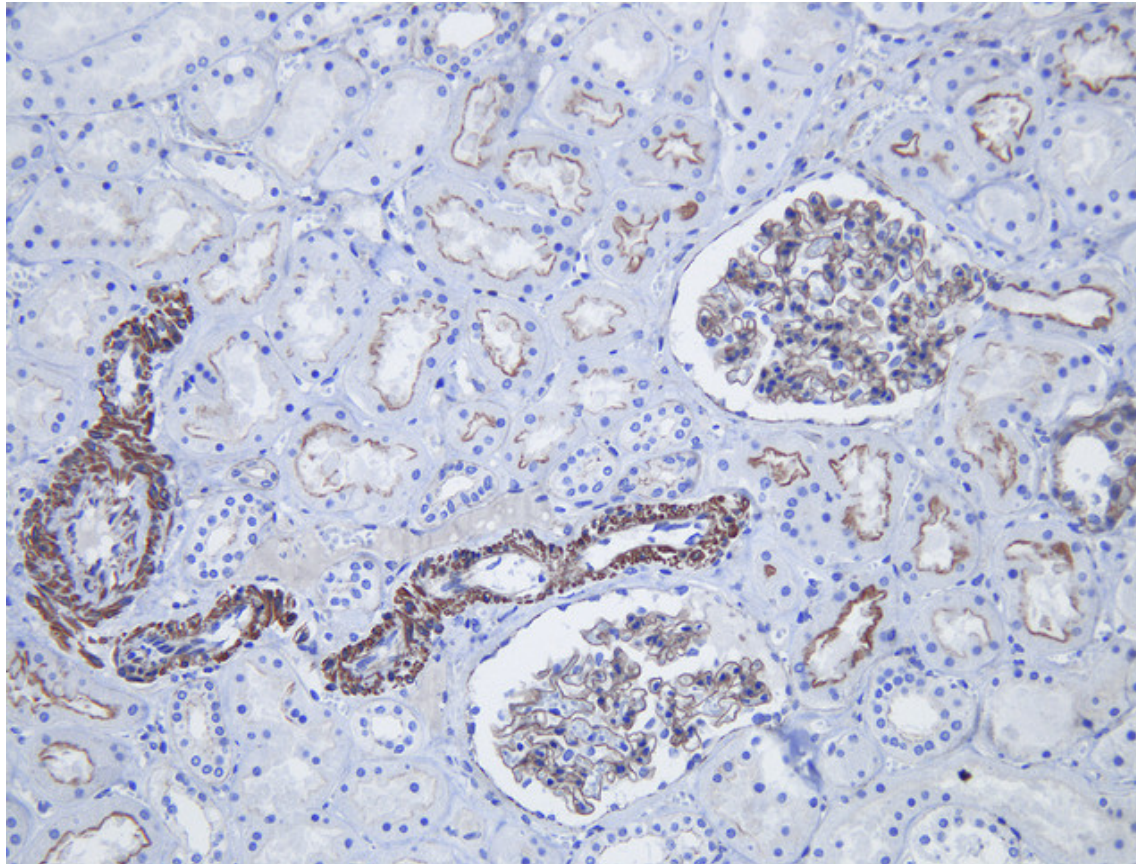
Példák:

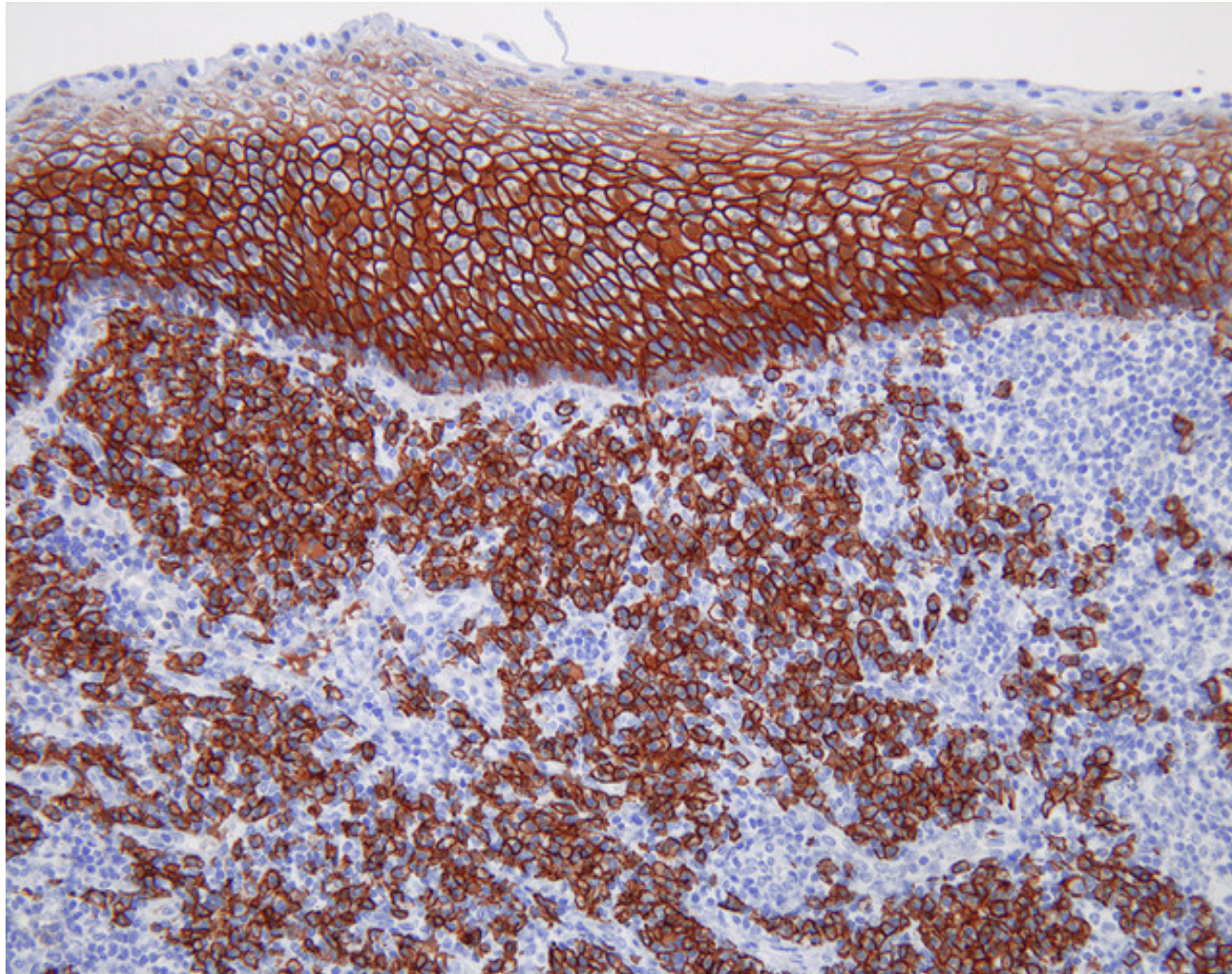


Urothelium: S0084 fehérje kifejeződése:
citoplazmális és magfestés is.

Monoklonális antitestnél
nemkívánt jelölés:

Simaizom α -aktin elleni
monoklonális antitest:
simaizomsejteket és a
vese proximális
tubulusait,
glomerulusokat is festi.



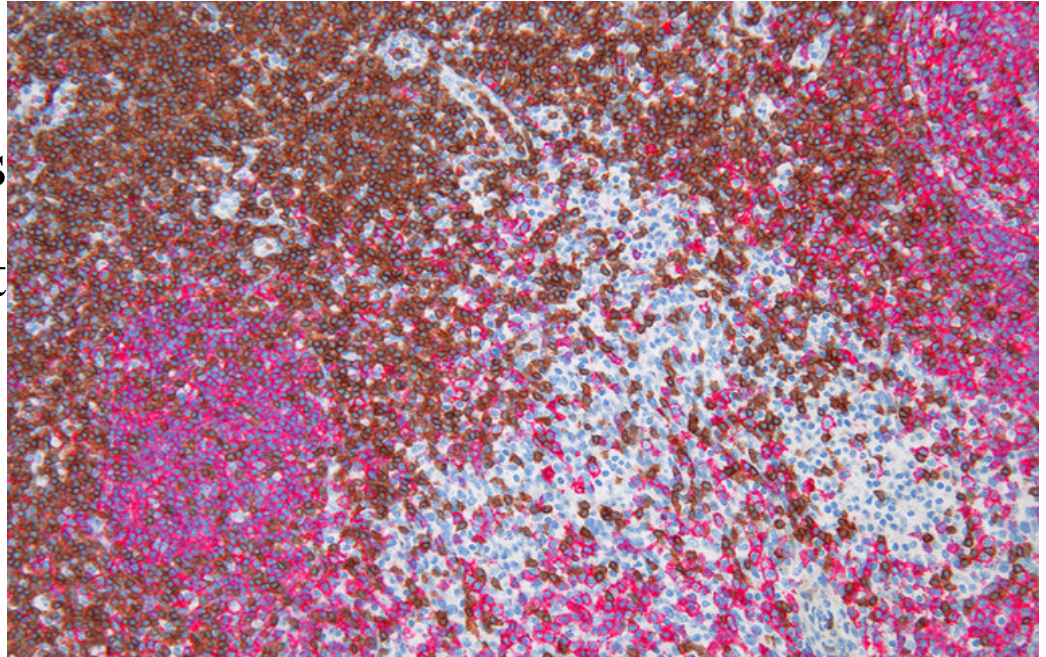


Syndecan-1
festés:
epithelium és
plazmasejtek
festődnek.

Syndecánok: sejt-sejt kapcsolatot, sejt-váz szerveződését, sejtosztódást, vándorlást szabályozó integráns membrán fehérjék.

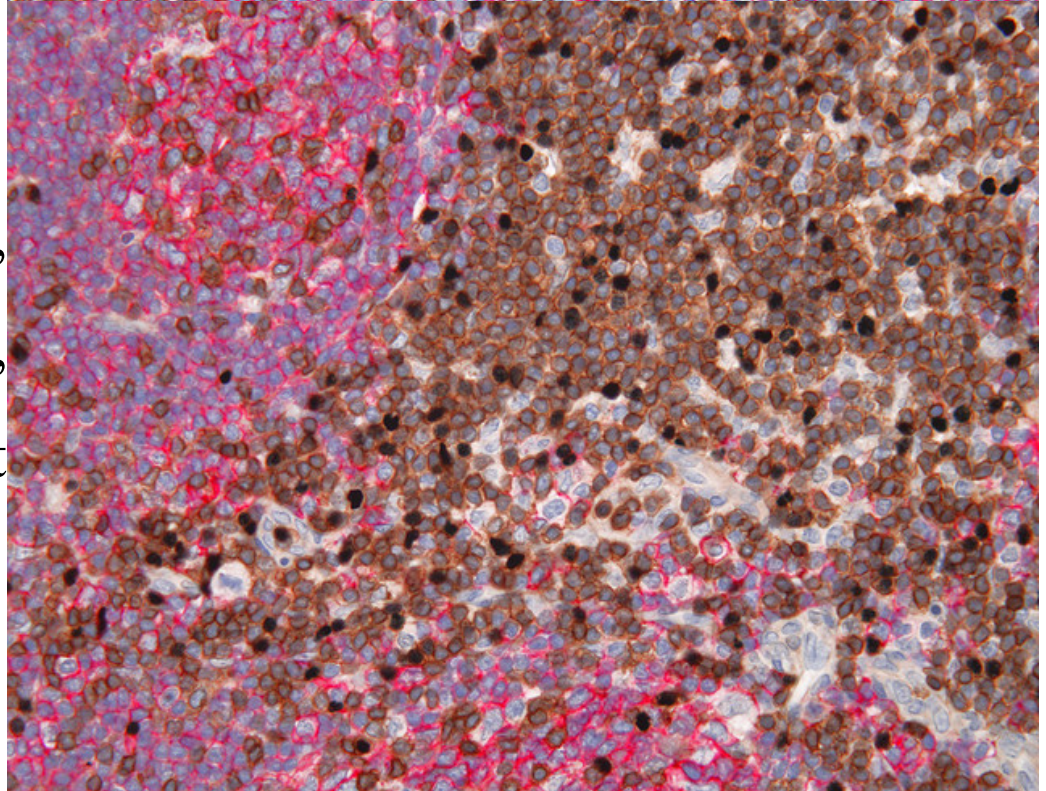
Dupla festés:

Alkaline foszfatáz festés
piros és barna színnel jelölt
antitestekkel.



Tripla festés:

piros: CD20: B sejt marker,
fekete: Fox P3: T sejt marker,
barna: CD3 kifejlett T sejt
markere.

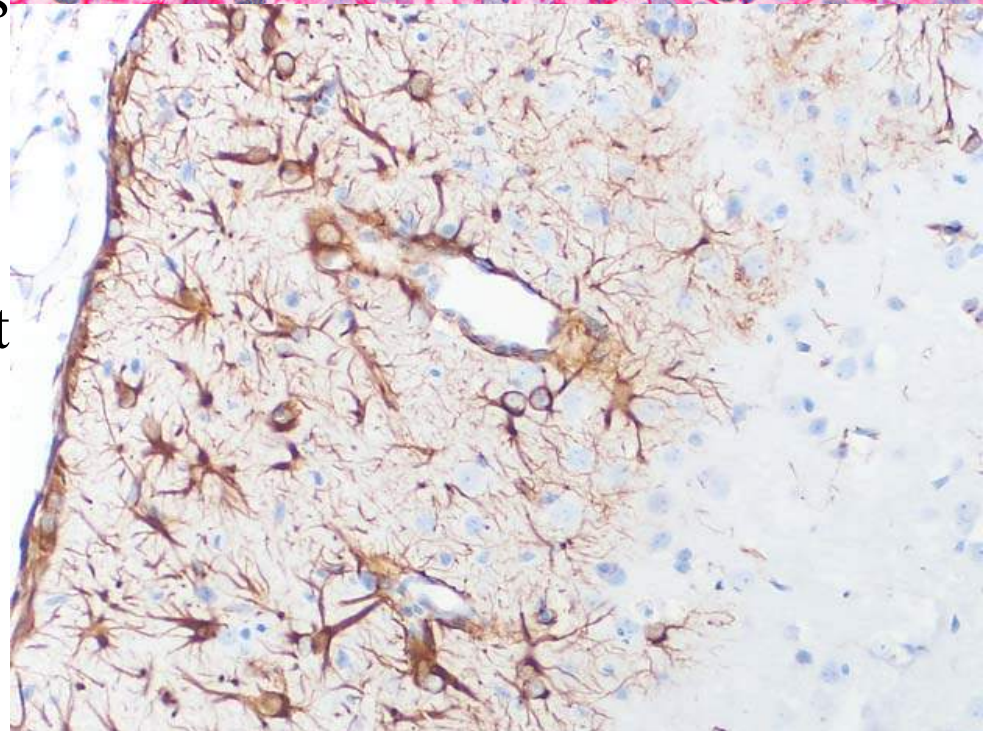
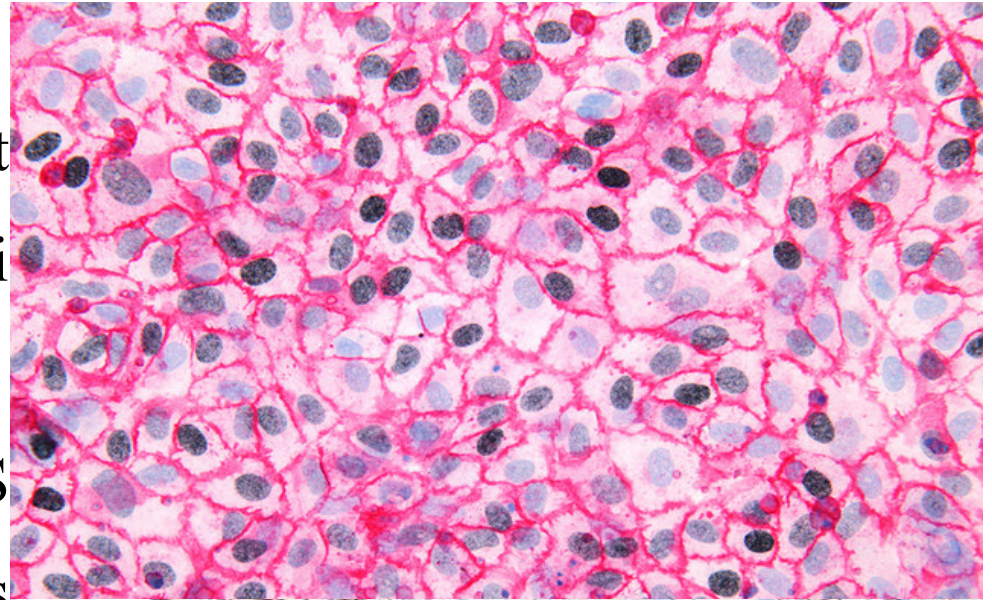


Dupla jelölés:

Piros: citoplazmát / membránt
jelölő alkalikus foszfatáz elleni
antitest,

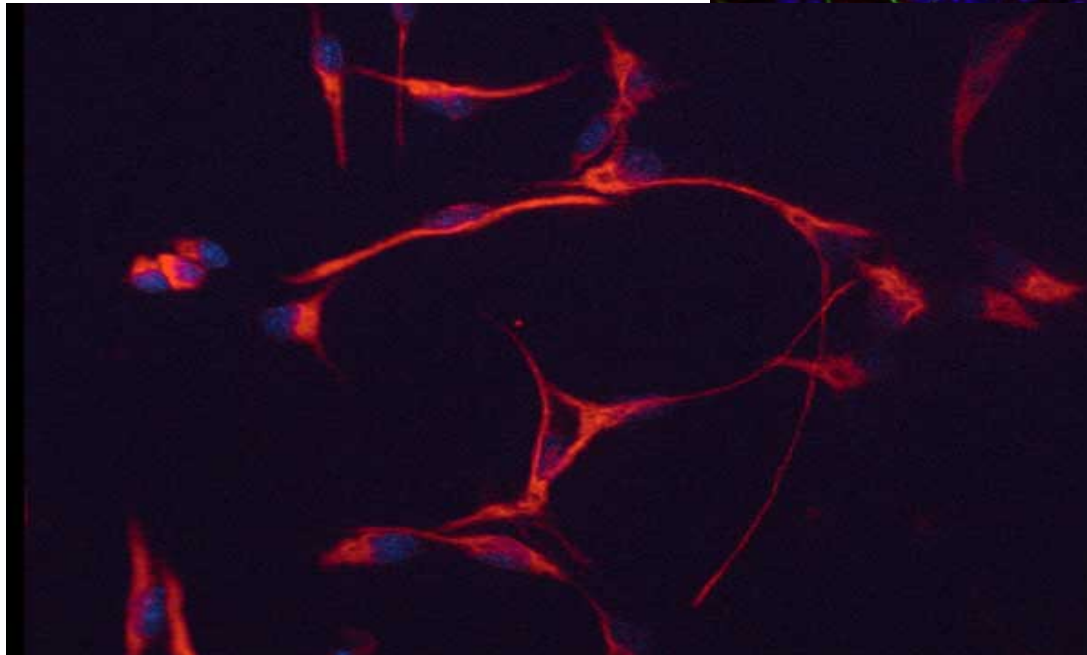
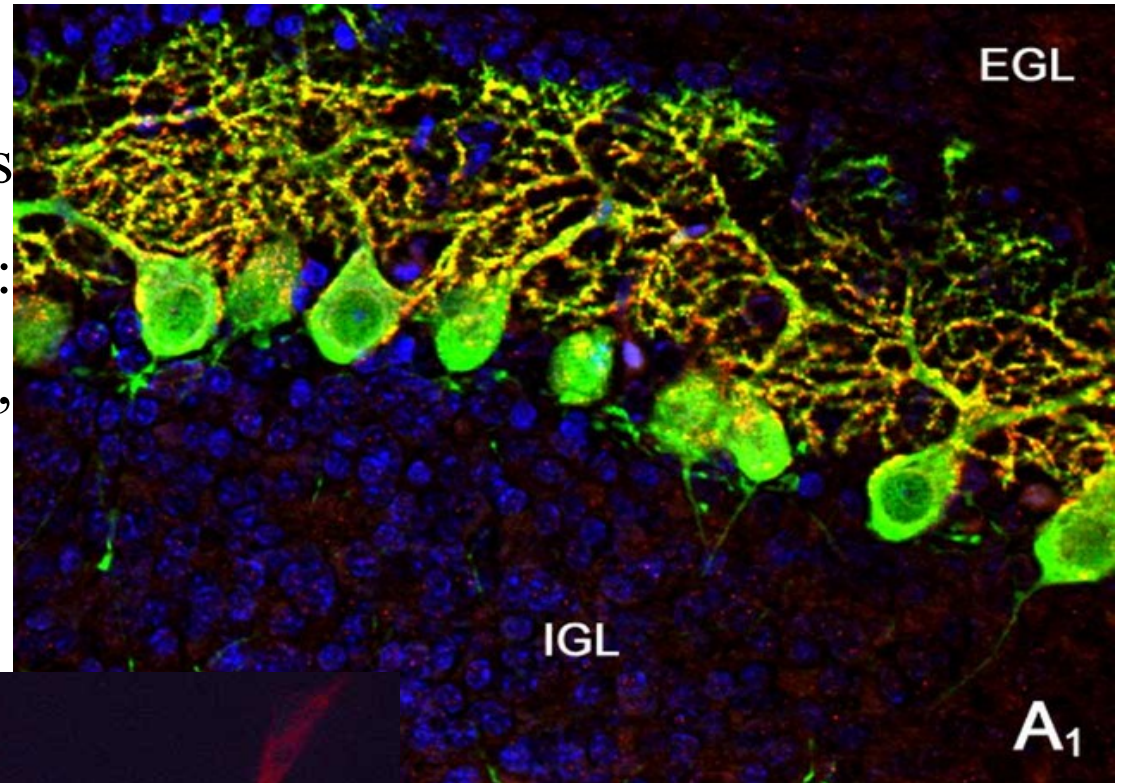
fekete: sejtmag DNS
szekvenciájára specifikus
antitest.

Nestin elleni antitest
asztrocitákat festi meg.



Fluorescens jelölés:

Többszörös fluorescens
jelölés: Kisagy: Calbindin:
zöld, DAG lipáz: piros,
sejtmagok: kék



Egyszeres fluorescens
jelölés: nektin asztrocitában

Kolokalizáció:

